

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04990

研究課題名(和文)聴覚前庭系に発現するカルシウムチャネルの機能とその薬理的制御に関する包括的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of the calcium channels and its relating mechanisms of the inner ear

研究代表者

稲垣 彰(Inagaki, Akira)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：70405166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウムイオンは生体の機能に重要な筋肉や神経などで重要な役割を果たしていることが知られている。聴覚機能に重要な内耳でも徐々にその機能が明らかにされているが、未解明な部分も多い。網羅的に検討することで、内耳におけるカルシウムイオンの制御メカニズムを明らかにし、薬剤による新たな機能制御につなげることを目指した。その結果、カルシウム感受性受容体の分布を新たに同定し、聴覚に必要な不可欠なことを明らかにした。本研究は内耳においてカルシウムイオンの恒常性の維持がどのように行われているかそのメカニズムの一端を明らかにし、それが薬理的に調節できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルシウムイオンは細胞内のシグナル伝達など重要な役割を果たし、また、細胞障害に重要な役割を果たすことからその恒常性維持は器官の機能維持に重要である。本研究は内耳においてカルシウムイオンの恒常性の維持がどのように行われているかそのメカニズムの一端を明らかにし、それが薬理的に調節できることを示した。将来的には、組織保護、すなわち聴覚保護や聴覚増強につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Calcium signaling plays important roles especially in excitable cells, such as myocytes and neuronal cells. The signal in the inner ear has been reported and its roles are partially elucidated, but there are number of issues that remain to be elucidated. Here we investigated inner ear calcium signaling by a comprehensive approach, aiming at manipulating it pharmacologically to have beneficial biological effects.

We identified calcium sensing receptor as a novel drug target in the inner ear and identified its cellular distribution in the cochlea for the first time. Also, a new technique developed in this study revealed it is susceptible for pharmacological inhibition. Pharmacological inhibition induced moderate hearing loss; demonstrating its essential role for hearing. This result shows a part of inner ear mechanism maintaining the unique ionic composition in the inner ear, especially that of calcium ion, which has not well evaluated to date.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 聴覚 蝸牛 カルシウム感知受容体 薬理学

1. 研究開始当初の背景

加齢や疾患による聴覚前庭系の障害は難聴やめまいを生じる。これらは生活の質を著しく下げ、社会生活を送ることを困難にする、頻度の高い障害である。例えば、世界では3.6億人が中度以上の(WHO, Fact sheet N° 300)、5000万人が高度の(Carlson, NEJM 2020)本邦でも進行する高齢化に伴い、2050年には高齢者人口が40%(財務省ホームページ)となる見込みであり、難聴を持つ人口の割合は増加傾向にある。また、前庭障害の症状である回転性めまいは1年あたり人口の4.9%が経験するとされ(Neuhauser HK, Curr Opin Neurobiol 2007)、また、その頻度は年齢と共に上昇する(Jonsson R et al. J Vestibular Res, 2004)。これら聴覚前庭系の障害は、コミュニケーション障害やめまいによる自動車運転の制限などを通して、各々の個人の生活の質を低下させるのみならず、国民の社会参画を妨げることから、本邦における耳鼻咽喉科領域の課題の一つである。

しかしながら、これらの方法に対する治療手段は現在でも充分とは言い難い状況である。多くの疾患は薬物治療の恩恵を受ける一方、一般に慢性的な難聴に対して確立された薬物療法はなく、補聴器や人工内耳といった聴覚路に対する刺激を増強する電子機器を用いて補聴、すなわち聴取聴力レベルの向上を行っているのが現状であった。過去数十年にわたりいずれの方法も徐々に改良を重ねられてきたが、これらの補聴の原理は不変であり、それぞれ、大きな増幅に困難がある、電極の数に限りがあり、電気刺激の回数、性質に回路上の制限があり音の性質が大きく変化し、言葉が聞き取りにくい、などの問題がある。このような背景から、難聴治療を大きく進歩させるためには、原理が異なる難聴治療、新しいアプローチが求められていた。

一方、内耳や前庭を含めて興奮性細胞は、陽イオンの流入により細胞が興奮する。ナトリウム、カルシウム、また有毛細胞ではカリウムが用いられるが、中でも Ca^{2+} は膜電位上昇に呼応して細胞内へと流入し、陽イオンとしてさらなる電荷の上昇に寄与するだけでなく、セカンドメッセンジャーとしての様々な生理的機能を持つことから、生体の機能調節のターゲットとなってきた。例として、L型カルシウムチャネルの拮抗薬であるジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬は降圧薬として、最近では同じく電位依存型カルシウムチャネルのサブユニットである1の細胞内輸送阻害薬であるプレガバリンによる慢性疼痛の治療が実用化されるなど、カルシウムシグナリングをターゲットとした機能調節は人類に極めて大きな恩恵を与えている。

感覚神経である内耳、前庭でも同様に Ca^{2+} シグナリングが機能していることは以前から知られていた。たとえば、L型カルシウムチャネルである1Dのノックアウトマウスは全聾となり、中・高度難聴を呈する遺伝難聴家系には本チャネルの機能不全が原因となる家系が見つまっている。また、動物実験ではリンパ液内の Ca^{2+} 濃度が上昇しても低下しても難聴が生じることが報告されており、重要な役割を果たしていることが示唆されてきた。その一つの理由として、有毛細胞かららせん神経節へと興奮を伝達する際のシナプス放出がカルシウムの流入をトリガーとしていることが示唆されている。一方で、内耳における Ca^{2+} の制御には未解明な部分も多く、新たな介入起点が発見される可能性があり、聴覚路における Ca^{2+} の制御の機構の解明が待たれる状況にあったことが、本研究の背景となった。

2. 研究の目的

以前より前庭系に対しては、経験的にルナリジンなどのピペラジン誘導体であるT型カルシウムチャネル拮抗薬、L型チャネル拮抗薬であるニモジピンなどジヒドロピリジン系薬剤が抗めまい薬として用いられてきた。また、近年にはカルシウムチャネルが聴覚系の神経保護のための治療のターゲットとなりうることが示唆されていた。これらの知見は治療のターゲットとしてのカルシウムチャネルの潜在的なポテンシャルを表すものと考えられるが、現在のところ聴覚前庭系においてカルシウムチャネルをターゲットとした薬剤が広く用いられていない。その理由として、聴覚前庭系のカルシウムチャネルの生理機能が未だ完全には明らかでなく、そのため聴覚前庭系に対する薬理作用の機序が十分に明らかでないことが挙げられる。

本研究の目的は、内耳に発現する分子を網羅的に検討することで、治療起点となりうる新たな Ca^{2+} シグナルに関連する分子機構を発見することである。さらに、発見された Ca^{2+} シグナル機構に対する薬剤による機能調節を試み、可能なら有用な薬効を発見することを目指す。さらに、既存薬物のスクリーニングを行い、新規薬効を発見することも併せて目的とする。

3. 研究の方法

蝸牛・前庭における新たな制御機構をスクリーニングするため、内耳の遺伝子発現情報より新たな Ca^{2+} 制御機構・チャネルをスクリーニングする。スクリーニングにより同定された遺伝子の分布を確認し、生理学的な機能を推定、薬剤による機能調節が可能かどうか検討に入れ、重要度の重み付けをする。

次に、聴覚・前庭系での薬効を検討するための、生理学的評価系を新たに構築する。 Ca^{2+} シグナルは全身の興奮性細胞に共通した仕組みであることが多く、全身投与では様々なoff target効果が予想されることから、in vivoでの内耳への選択的投与と同時に評価が可能となるようなシ

システムが必要となるが、そのようなシステムの報告はないことから、開発を行う。開発後にシステムを用いて、新たに同定された機構の薬理的な阻害、活性化薬や、既知の活性化薬の薬剤の投与を行う。さらに必要であれば、遺伝子改変マウスを作成、詳細な検討を行う。

4. 研究成果

初めに新たな内耳 Ca^{2+} シグナリング機構の探索のため、内耳遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、腎尿細管や副甲状腺でカルシウムの再吸収やカルシウム濃度感知に必要な不可欠な機能を果たすカルシウム感知受容体 (Calcium sensing receptor; CaSR) が同定された。確認実験として内耳 mRNA より逆転写を行い cDNA を作成、全長を確認し、内耳特異的な variant を探索したが、同定されなかった。市販のモノクローナル抗体を用いて Western blot を行い、分子量の確認、条件を変更して糖鎖修飾の確認を行ったが、いずれも腎に発現する CaSR と内耳に発現する CaSR とに分子量に検出可能な違いは見られなかった。

同一の抗体を用いて免疫組織化学法を用いて組織内分布を確認した。らせん靭帯、蝸牛軸の線維芽細胞に発現が見られた。蝸牛内の支持細胞は細胞間結合により細胞間相互にイオンの交通がある、いわゆる合体体を形成している。 Ca^{2+} の CaSR の発現は、そのいずれもが外リンパ液と接する区画に存在することから、血液や脳脊髄液より低濃度となっている外リンパ液の Ca^{2+} 濃度形成に関与することが示唆された。

次に、CaSR の生理学的な役割について、そのインパクトを検証するために、Wistar/ST ラットを用いて *in vivo* での薬効評価システムの確立を目指した。パッチクランプ法に準じて投与ガラス管内の dialysis と還流による多剤の連続的な評価システムを目指したが、困難であった。正円窓からの投与により投与前投与後で DMSO による vehicle では全く聴力変動が見られない生理学的評価系を始めて開発し、蝸牛における分子機能の評価を行ったところ、2 剤のアロステリック阻害薬の投与によって同じように中度難聴を呈したことから、本シグナル系は聴覚の正常な機能に必要な不可欠であることが示唆された (Minakata T, Inagaki A et al Front Mol Neurosci, 2019)。

CaSR の機能の詳細の解析のため、CaSR のノックアウトマウスの作製に着手した。CaSR ノックアウトマウスはカルシウム代謝異常のため致死であり、既報告のとおり、代謝異常の大小のため PTH を同時ノックアウトする、ダブルノックアウトマウスの作製を研究期間を勘案し CRISPR 技術を用いたダブルノックアウトを行った。現在も作成を行っているが、技術的な困難のため難航している。

さらなる検討として、本研究で確立された *in vivo* 評価システムの改良を意図して、検討を行った。本研究で用いた方法では正円窓から少量の薬剤溶解液を注入し、単純拡散によってリンパ液内に拡散することを期待したものである。現在までのリンパ流に関する報告などを勘案すると合理的な方法と考えており、リアルタイムで測定される聴性脳幹反応の結果もゆるやかな拡散を経てプラトーに達するとの推測と矛盾しないが、厳密にどの程度の薬剤が作用しているのかは不明である。この欠点に対応するため、少量のリンパ液から薬剤濃度を測定する技術の確立を目指し、微量リンパ液から液体クロマトグラフィー法 (LS/MS/MS) を用いて測定する手法を検討した。予備実験の段階であるが、サブナノモルの測定では良好な結果を得た。

一方、BHQ など既知のカルシウムチャネル作動薬を用いた聴力上昇効果も確認したが、わずかに ABR での、波の変形と振幅の増大が見られるものの、有意な変動は今回の検討では検出できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Harabuchi Y, Kishibe K, Tateyama K, Morita Y, Yoshida N, Kunimoto Y, Matsui T, Sakaguchi H, Okada M, Watanabe T, Inagaki A, Kobayashi S, Iino Y, Murakami S, Takahashi H, Tono T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Clinical features and treatment outcomes of otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis (OMAAV): A retrospective analysis of 235 patients from a nationwide survey in Japan.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 97-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2016.1177926.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inagaki A, Minakata T, Katsumi S, Murakami S.	4. 巻 0
2. 論文標題 Concurrent treatment with intratympanic dexamethasone improves facial nerve recovery in Ramsay Hunt syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurol Sci.	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jns.2020.116678. Epub 2020 Jan 9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inagaki A, Yamashita Y, Mori Y, Takeuchi E, Asaoka K, Murakami S.	4. 巻 0
2. 論文標題 An Unusual Tumor of the Ear: Pilomatricoma in a Middle-Aged Woman.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Rep Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/4975216. eCollection 2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inagaki A, Minakata T, Katsumi S, Murakami S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Concurrent Treatment With Intratympanic Dexamethasone for Moderate-Severe Through Severe Bell's Palsy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otol Neurotol.	6. 最初と最後の頁 e1018-e1023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1097/MAO.0000000000002377.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eliezer M, Tran H, Inagaki A, Vřkrillaud B, Takahashi M, Marie JP, Hautefort C, Herman P, Murakami S, Kania R.	4. 巻 40
2. 論文標題 Clinical and Radiological Characteristics of Malignant Tumors Located to the Cerebellopontine Angle and/or Internal Acoustic Meatus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otol Neurotol.	6. 最初と最後の頁 1237-1245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1097/MAO.0000000000002360.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minakata T, Inagaki A, Yamamura A, Yamamura H, Sekiya S, Murakami S.	4. 巻 0
2. 論文標題 Calcium-Sensing Receptor Is Functionally Expressed in the Cochlear Perilymphatic Compartment and Essential for Hearing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci.	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fnmol.2019.00175. eCollection 2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minakata T, Inagaki A, Sekiya S, Murakami S.	4. 巻 46
2. 論文標題 Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of facial nerve swelling in patients with severe Ramsay Hunt syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 687-695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.anl.2018.12.015. Epub 2019 Jan 7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Motegi M, Inagaki A, Minakata T, Sekiya S, Takahashi M, Sekiya Y, Murakami S.	4. 巻 46
2. 論文標題 Developmental delays assessed using the Enjoji Scale in children with cochlear implants who have intellectual disability with or without autism spectrum disorder.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 498-506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2018.12.003. Epub 2018 Dec 19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inagaki A, Motegi M, Sato Y, Hattori H, Murakami S.	4. 巻 46
2. 論文標題 The inflammatory pseudotumor presenting periodic acid-Schiff-positive inclusions with acute unilateral facial nerve palsy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 465-468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2018.06.009. Epub 2018 Jul 2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 稲垣 彰	4. 巻 37
2. 論文標題 【感覚受容 最前線】聴覚 蝸牛におけるイオン調節機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience 臨床神経科学	6. 最初と最後の頁 1474-1477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi M, Kabaya K, Sekiya K, Matsuda F, Sekiya Y, Esaki S, Sato Y, Inagaki A, Murakami S.	4. 巻 27
2. 論文標題 An improved system for grading and treating tinnitus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 30808-30809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2017.11.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aihara N, Yamada H, Takahashi M, Inagaki A, Murakami S, Mase M.	4. 巻 57
2. 論文標題 Postoperative Headache after Undergoing Acoustic Neuroma Surgery via the Retrosigmoid	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir	6. 最初と最後の頁 634-640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2017-0108.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南方 寿哉、稲垣 彰、関谷 真二、村上 信五
2. 発表標題 蝸牛内カルシウム制御に関与する新たな分子機構の検
3. 学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲垣彰
2. 発表標題 蝸牛の新たなCa ²⁺ 調節機構
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 稲垣彰	4. 発行年 2016年
2. 出版社 グバプロ	5. 総ページ数 343
3. 書名 広川信隆 編 ブレインサイエンスレビュー2016	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鶴川 眞也 (Ugawa Shinya) (20326135)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	蒲谷 嘉代子 (Kabaya Kayoko) (50569259)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教 (23903)	
研究 分担者	富永 真琴 (Tominaga Makoto) (90260041)	大学共同利用機関法人自然科学研究機構（新分野創成センター）・生命創成探究センター・教授 (82675)	
研究 分担者	村上 信五 (Murakami Shingo) (80157750)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授 (23903)	